

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Sonja Pejić

**Pojavnost mikotoksina u komercijalnim pivima hrvatskih
industrijskih i craft pivovara**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za bioproceno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Osnove bioprocenog inženjerstva

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016., održanoj 25. travnja 2016.

Mentor: doc. dr. sc. Natalija Velić,

Komentor: doc. dr. sc. Bojan Šarkanj

Pojavnost mikotoksina u komercijalnim pivima hrvatskih industrijskih i craft pivovara

Sonja Pejić, 320-DI

Sažetak:

Tijekom skladištenja i na polju žitarice su izložene različitim vrstama plijesni koje biosintetiziraju vrlo toksične sekundarne metabolite - mikotoksine. Mikotoksini kontaminirajući žitarice koje se koriste u proizvodnji piva dospijevaju u sladovinu i pivo. Cilj istraživanja bio je usporediti pojavnost mikotoksina u devetnaest craft i petnaest industrijskih piva. Deoksinivalenol je mikotoksin skupine trihotecena kojeg biosintetiziraju plijesni roda *Fusarium*. Tijekom procesa proizvodnje piva DON je stabilan te prelazi iz sladovine u pivo i nusproizvode procesa - otpadni kvasac i trop. Analiza prisutnosti DON-a u pivima je izvođena na sustavu za tekućinsku kromatografiju sa masenom spektrometrijom – LC-MS/MS. U usporedbi sa craft pivima, rezultati istraživanja ukazuju na veće koncentracije DON-a u industrijskim pivima.

Ključne riječi: mikotoksini, deoksinivalenol, LC-MS/MS, pivo

Rad sadrži: 51 stranica
12 slika
7 tablica
0 priloga
57 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|----------------------------------|---------------|
| 1. prof.dr.sc. Vinko Krstanović | Predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Natalija Velić | Član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. Bojan Šarkanj | Član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. Tomislav Klapac | Zamjena člana |

Datum obrane: 26. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
 Faculty of Food Technology Osijek
 Department of Process Engineering
 Subdepartment of Bioprocess Engineering
 Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Basics of Bioprocess Engineering

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no VII. held on April 25, 2016.

Supervisor: Natalija Velić, PhD, assistant prof.

Co-supervisor: Bojan Šarkanj, PhD, assistant prof.

The incidence of mycotoxins in commercial beers Croatian industrial and craft breweries

Sonja Pejić, 320-DI

Summary: During the storage and in the field, grains are exposed to various types of molds that are biosynthesizing highly toxic secondary metabolites - mycotoxins. Mycotoxins of contaminated crops which are used in beer production found their way in beer and malts. The aim of this study was to compare the presence of mycotoxins in nineteen craft and fifteen industrial beer. Deoxynivalenol (Vomitoxin) is a mycotoxin of trichothecenes produced by *Fusarium* fungi. During the brewing process DON is stable and passes from the wort into beer and by products of the process - waste yeast and trop. Analysis of the presence of DON in beers is run on the system for liquid chromatography mass spectrometry LC-MS/MS. Compared with craft beers, the survey results indicate a higher concentration of DON in industrial beers.

Key words: mycotoxins, deoxynivalenol, LC-MS/MS, beer

Thesis contains: 51 pages
 12 figures
 7 tables
 0 supplements
 57 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Vinko Krstanović, PhD, prof. | chair person |
| 2. Natalija Velić, PhD, assistant prof. | Supervisor |
| 3. Bojan Šarkanj, PhD, assistant prof. | Co-supervisor |
| 4. Tomislav Klapac, PhD, prof. | stand-in |

Defense date: September 26, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
 Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PLIJESNI.....	4
2.2. MIKOTOKSINI	6
2.3. FUSARIUM MIKOTOKSINI	9
2.3.1. Trihoteceni.....	10
2.3.2. Deoksinivalenol (DON)	12
2.4. PIVO.....	14
2.5. MIKOTOKSINI U PIVU	17
2.6. ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA - TANDEMSKA MASENA SPEKTROMETRIJA (LC-MS/MS).....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. ZADATAK.....	28
3.2. MATERIJAL I METODE.....	28
3.2.1. Priprema standarda.....	28
3.2.2. Uzorkovanje.....	29
3.2.3. Analiza mikotoksina.....	32
3.2.4. Uvjeti i instrumenti.....	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA	45

Popis oznaka, kratica i simbola

3-AcDON	3-acetil deoksinivalenol
15-AcDON	15-acetil deoksinivalenol
AFB1	aflatoksin B1
AFB2	aflatoksin B2
AFM1	aflatoksin M1
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (eng. atmospheric pressure chemical ionization)
API	ionizacija pri atmosferskom tlaku
APLI	ionizacija laserom pri atmosferskom tlaku
APM	aptameri
APPI	fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (eng. atmospheric pressure photoionization)
a_w	aktivitet vode
CC	kolizijska ćelija
CEM	kontinuirani množitelj elektrona (eng. continuous electron multiplier)
CEP	ulazni potencijal kolizijske ćelije (eng. collision cell entrance potential)
CXP	napon u izlaznom dijelu kolizijske ćelije (eng. cell exit potential)
DAS	diacetoksiscirpenol
DF	deflektor
DON	deoksinivalenol
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. European Food Safety Authority)
ESI	elektrosprejna ionizacija
FAB	bombardiranje brzim atomima
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. Food and Agriculture Organization)
FB1	fumonizin B1
FB2	fumonizin B2

FD	desorpcija poljem
FI	ionizacija poljem
FUS X	fuzarenon X
GC	plinska kromatografija
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high performance liquid chromatography)
HT-2	HT-2 toksin
IAC	imunoafinitetne kolone
IEC	ionski izmjenjivači
LC	tekućinska kromatografija
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija–tandem masena spektrometrija (eng. liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)
LOD	limit detekcije
MALDI	laserska desorptivna ionizacija potpomognuta matriksom (eng. matrix assisted laser desorptive ionisation)
MIP	molekularno utisnuti polimeri
MRM	višestruko praćenje reakcija (eng. multiple reaction monitoring)
MS	maseni spektrometar
NIV	nivalenol
NN	Narodne novine (službeni list legislative Republike Hrvatske)
NP-SPE	normalna faza-ekstrakcija na krutoj fazi
OTA	ohratoksin A
PAT	patulin
RP-SPE	reverzna faza- ekstrakcija na krutoj fazi
SPE	ekstrakcija na krutoj fazi (eng. solid phase extraction)
SSI	ionizacija soničnim sprejem
S/N	odnos signala i šuma
T-2	T-2 toksin

TDI tolerirani dnevni unos (eng. tolerable daily intake)

ZEA zearalenon

1. UVOD

Plijesni su mikroskopske heterotrofne aerobne višestanične gljive koje mogu proizvoditi toksične sekundarne metabolite – mikotoksine. Riječ mikotoksin dolazi od grčkih riječi *mykes* – *gljiva* i latinske *toxicon* – *otrov*. Mikotoksini kontaminiraju žitarice na polju i u uvjetima skladištenja, a najznačajniji su aflatoksini B1 i M1 (AFB1, AFM1), ohratoksin A (OTA), zearalenon (ZEA), fumonizini B1 i B2 (FB1, FB2), trihoteceni (deoksinivaleonol (DON), T-2 i HT-2 toksini), citrinin (CIT) i patulin (PAT). Procijenjeno je da je više od 25% svjetskih usjeva kontaminirano mikotoksinima (Charmley i sur., 1995), iako novija istraživanja pokazuju da je ta brojka veća od 90% (Streit i sur., 2013).

Trihoteceni su metaboliti seskviterpenoida koje produciraju mnogi rodovi gljiva uključujući *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* i drugi (Hussein i sur., 2001; Bennett i sur., 2003). Uzročnici su različitih bolesti (mikotoksikoze) kod ljudi i životinja. Unutar trihotecenske grupe, toksin koji kontaminira žitarice i uzrokuje odbijanje hrane kod životinja je deoksinivaleonol. Njegova prisutnost potvrđena je u namirnicama proizvedenim od žitarica kao što su kruh, pivo, tjestenina i druge. Znanstveni odbor za hranu (Scientific Committee on Food) postavio je prihvatljivi dnevni unos (TDI) DON-a za ljude koji iznosi $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase (EFSA, 2013).

Kontaminirajući ječam i druge žitarice koje se koriste u proizvodnji piva, mikotoksini prelaze u sladinu te u pivo. Njihova koncentracija tijekom proizvodnje se uglavnom smanjuje, ali neki termostabilni i vodotopljivi mikotoksini kao što je DON i ostali trihoteceni grupe B, zaostaju u svim fazama proizvodnje piva. U ovom radu koncentracija mikotoksina u pivu određena je LC-MS/MS metodom, koju odlikuju velika selektivnost i točnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLIJESNI

Plijesni su mikroskopske heterotrofne višestanične gljive, koje rastu u obliku nitasto isprepletenih filamenata, hifa. Boja hifa ovisi o drugim sekundarnim metabolitima – pigmentima koje plijesan može proizvoditi. Tako su plijesni roda *Fusarium* najčešće crvenkaste boje od rubrofusarina. Isprepletene niti hifa tvore micelij koji se kao paučinasta, prašnjava prevlaka rasprostire po podlozi (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Micelij se pojavljuje kao bazalni ili zračni. Bazalni micelij zahvaća i ulazi u hranjivu podlogu te crpi hranjive tvari iz nje, dok micelij koji se izdiže iz podloge na sebi nosi spore kojima se razmnožava. Osim razmnožavanja pomoću spora (spolno ili nespolno), plijesni se razmnožavaju i preko fragmenata hifa (također spolno ili nespolno) odnosno vegetativno. Najvažniji čimbenici koji utječu na razvoj plijesni su temperatura i sadržaj vode. Plijesni rastu pri temperaturi od 10 °C do 40 °C i aktivitetu vode (a_w) većem od 0,7.

Danas je poznato više od 100 000 vrsta plijesni. Više od 400 vrsta se smatra toksičnima, a za 5% je poznato da proizvode toksične tvari (mikotoksine), koje imaju neželjen učinak kako na životinje tako i na čovjeka (Oliveira i sur., 2013).

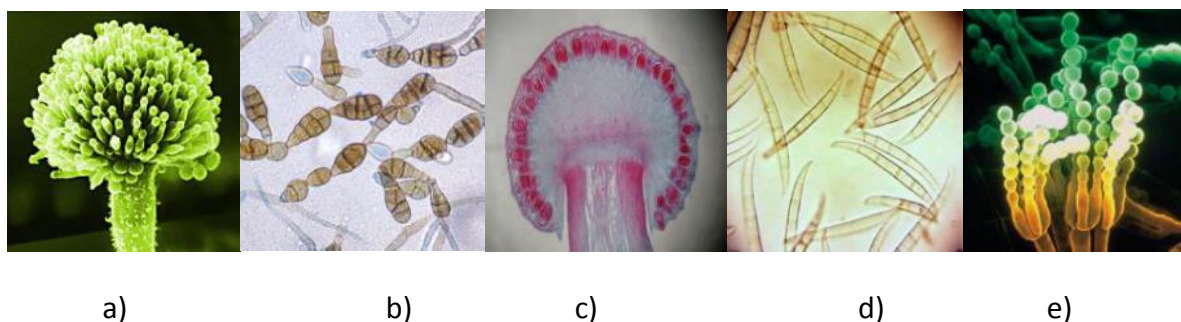
S obzirom na vrijeme kontaminacije biljke ili ploda plijesni se dijele na: plijesni s polja (rodovi *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*), plijesni u skladištima (rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*) i plijesni uznapređovalog kvarenja (rodovi *Papulospora*, *Sordaria*, *Mucor*, *Chaetomium* i *Rhizopus*) (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Plijesni koje se najčešće mogu pronaći na ječmu i pšenici na polju uključuju vrste rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium*, pri čemu najveće probleme u sladarstvu i pivarstvu predstavljaju plijesni roda *Fusarium* (Papadopoulou i sur., 1999). Šarža zrna ječma ili pšenice koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana plijesnima roda *Fusarium*, smatra se nepogodnom za slađenje (Schwarz, 1997). Primjena kontaminiranog slada u proizvodnji piva može uzrokovati različite probleme, kao što su promjena u boji i sastavu sladovine, prisutnost metabolita plijesni (mikotoksini) i pojavu prekomjerna pjenjenja piva. Mikroba kolonizacija zrna ječma uglavnom je ograničena na vanjski sloj zrna, na pljevicu i na prostor između pljevice i perikarpa, ali događa se da prodre i u endosperm (Van Nierop i Rautenbach, 2006).

Istraživanje koje su proveli Schwarz i sur., (2002) pokazalo je da plijesni roda *Fusarium* sintetiziraju amilolitičke i proteolitičke enzime, odnosno uočeno je da kod zrna ječma koja su inficirana plijesnima roda *Fusarium* dolazi do razgradnje škroba u endospermu te da nedostaje proteinski matriks koji obavija granule škroba.

2.2. MIKOTOKSINI

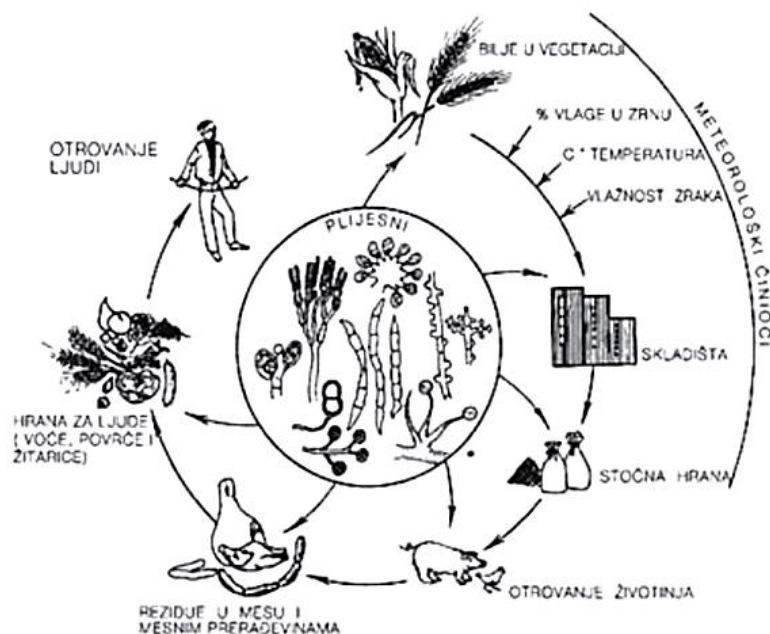
Mikotoksini su vrlo toksični sekundarni produkti metabolizma plijesni, koji već pri malim koncentracijama štete zdravlju čovjeka i životinja. Relativno su male molekule ($M_r < 1000$), te su uzrok raznih toksičnih, kancerogenih, mutagenih i imunotoksičnih bolesti, tzv. mikotoksikoza, koje su karakteristične za zemlje s lošijim poljoprivredno-veterinarskim i higijenski statusom. Simptomi mikotoksikoza ovise o nizu čimbenika: koncentraciji i dužini izlaganja mikotoksinu, o vrsti i toksikodinamičkim osobinama mikotoksina (apsorpciji, hidrofilnosti/lipofilnosti, distribuciji u tkivima i organima, metabolizmu i poluvremenu raspada te eliminaciji), zatim o vrsti, spolu, starosti i zdravstvenom statusu čovjeka ili životinje (Kosalec i sur., 2004). Plijesni vrsta *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Claviceps* spp., *Fusarium* spp., i *Penicillium* spp., se ubrajaju u najvažnije producente mikotoksina (slika 1).



Slika 1 Plijesni a) *Aspergillus* spp., b) *Alternaria* spp., c) *Claviceps* spp., d) *Fusarium* spp., i e) *Penicillium* spp. (Šarkanj, 2014)

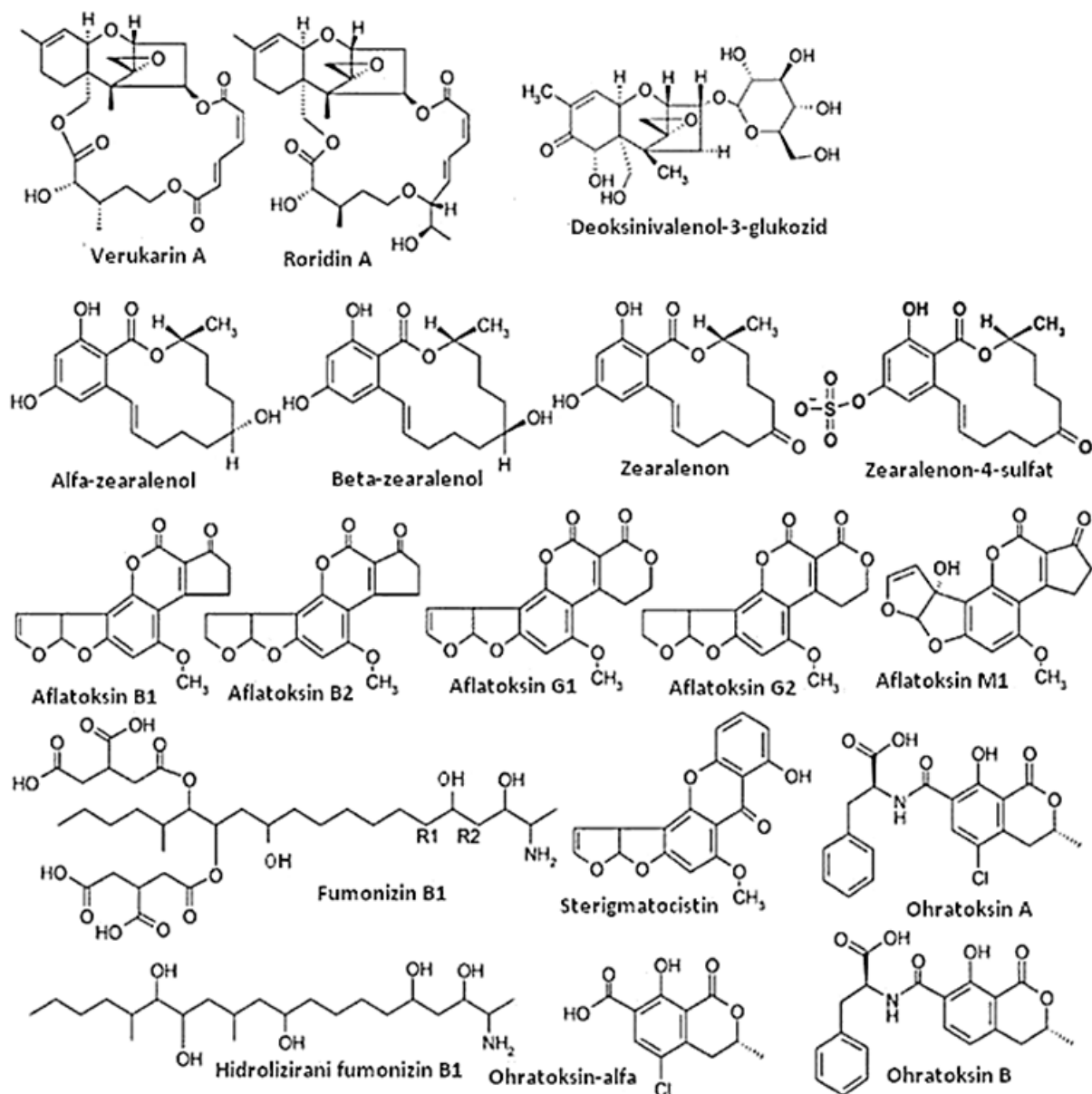
Mikotoksini najčešće kontaminiraju hranu za ljude i životinje te predstavljaju ozbiljan problem proizvođačima hrane diljem svijeta. Hrana se može kontaminirati na direktan i indirektan način (slika 2). Direktna kontaminacija podrazumijeva kontaminaciju prehrambenog materijala s mikotoksikogenim plijesnima, dok indirektna kontaminacija podrazumijeva kontaminaciju prehrambenog materijala (meso, mlijeko, jaja životinja) mikotoksinima. Na taj način izravnom konzumacijom kontaminirane hrane (primarna mikotoksikoza) i konzumacijom kontaminiranog mesa životinja koje su hranjene zaraženim krmivom (sekundarna mikotoksikoza) mikotoksini ulaze u hranidbeni lanac čovjeka te dovode do različitih akutnih stanja.

Sprječavanje rasta plijesni na hrani jedini je način suzbijanja kontaminacije hrane mikotoksinima. Ipak, prisutnost plijesni u hrani ne znači da je hrana nužno kontaminirana mikotoksinima (ovisno o uvjetima rasta i vrsti plijesni). Isto tako, izostanak vidljivog rasta plijesni na hrani ne znači da ona nije kontaminirana mikotoksinima, budući da mikotoksini zaostaju u hrani i nakon prestanka rasta plijesni.



Slika 2 Put mikotoksina u hranidbenom lancu (Ožegović i Pepeljnjak, 1995)

Od 1960. godine do danas otkriveno je više od 400 različitih mikotoksina raznovrsnih kemijskih struktura i bioloških učinaka. Kemijske strukture nekih mikotoksina prikazane su na **slici 3**.



Slika 3 Kemijske strukture nekih mikotoksina (prilagođeno iz Sulyok i sur., 2007)

2.3. FUSARIUM MIKOTOKSINI

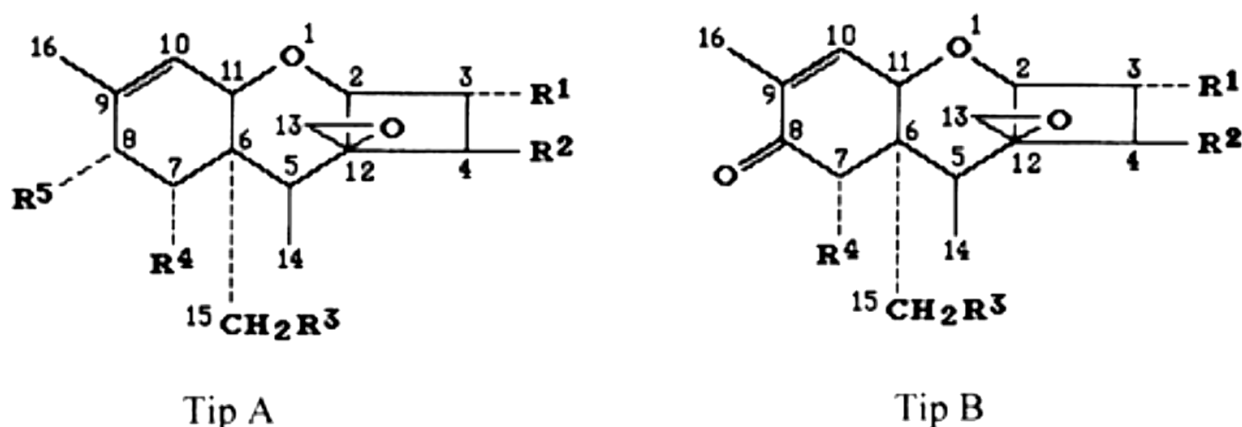
Mikotoksini koje sintetiziraju plijesni roda *Fusarium* su:

- I. Fumozini (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*),
- II. Zearalenon (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*),
- III. Moniliformin (*F. proliferatum*, *F. subglutinaus*, *F. avenaceum*) i
- IV. Trihoteceni:
 - T-2 i HT-2 toksin (*F. poae*, *F. sporotrichioides*),
 - Diacetoksiscirpenol (DAS) i monoacetoksiscirpenol (*F. poae*, *F. sporotrichioides*),
 - Neosolaniol (*F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. acuminatum*),
 - Deoksinivalenol (DON) (*F. graminearum*, *F. culmorum*),
 - Nivalenol (NIV) (*F. cerealis*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*) (Logrieco, 1990).
 - Fuzarenon X (FUS X),
 - 3-acetildeoksinivalenol (3-AcDON) i 15-acetildeoksinivalenol (15-AcDON).

Plijesni roda *Fusarium* biljni su patogeni koji uzrokuju fuzarijsku palež klasa pšenice i crne snijeti kod kukuruza i producenti su mikotoksina. Najvažniji *Fusarium* toksini su DON, T-2, HT-2, NIV, FUS X, DAS, 3-AcDON, 15-AcDON, ZEA i fumonizini. Uzročnici su različitih bolesti u ljudi i životinja.

2.3.1. Trihoteceni

Plijesni rodova *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*), *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* i *Verticimonosporium* biosintetiziraju trihotecene, skupinu koju čine oko 170 različitih sekundarnih metabolita. Trihoteceni su najveća skupina danas poznatih mikotoksina (Duraković, 2003). Prvi izolirani toksin iz ove skupine bio je trihotecen iz plijesni *Trichothecium roseum*. Izoliran je 1949. godine, ali je daljnje istraživanje obustavljeno zbog njegove toksičnosti pa je tek 1971. godine objavljeno njegovo otkriće (Plavšić, 2006). Trihoteceni se dijele na makrocikličke i nemakrocikličke trihotecene. Nemakrociklički trihoteceni su najčešći i dijele se na grupe: tip A, koji imaju vodik ili ester na C-8 poziciji (T-2 toksin, HT-2 toksin, neosolaniol, DAS) dok tip grupe B sadrži keton i uključuje DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV i fuzarenon X (Bennett i sur., 2003). Kemijska struktura trihotecena tipa A i tipa B prikazan je na **slici 4**. Treća grupa koja ima drugi epoksidni prsten na C-7, 8 ili C-9, 10 i toksini četvrte skupine (tip D) sadrže makrociklički prsten između C-4 i C-15 s dvije ester veze (Eriksen, 2004). Trihotecene tipa C i D ne producira rod *Fusarium* (Eriksen, 2004).



Slika 4 Kemijska struktura trihotecena tipa A i tipa B (Stojanović, 2008)

Trihoteceni se većinom nalaze u pšenici, raži, ječmu, zobu i kukuruzu te time dopijevaju u prehranu čovjeka (brašno, kukuruzne pahuljice, hrana za novorođenčad, slad, pivo i drugo) i životinja (krmne smijese). Glavni simptomi otrovanja uključuju abdominalne bolove, mučninu, povraćanje, dijareju i vrtoglavicu koji se javljaju otprilike jedan sat nakon ingestije pšenice, kukuruza ili riže kontaminiranih deksinivalenolom, nivalenolom i zearalenonom (Peraica i Domijan, 2001).

Trihoteceni su snažni inhibitori sinteze proteina u eukariota te oštećuju stanice timusa, crijeva, slezene te limfnih žlijezda (Šarkanj i sur., 2010). T-2 je najtoksičniji trihotecen koji već pri 0,5 mg ima akutno djelovanje na imunološki sustav životinje. Manje toksičan predstavnik je DON koji pri unosu malih koncentracija uzrokuje odbijanje hrane u životinja. DON i derivati su odgovorni za najmanje 35 prijavljenih toksikoza od 1961. godine u ruralnim područjima Indije, Kine i Japana (Ehling i sur., 1997).

2.3.2. Deoksinivalenol (DON)

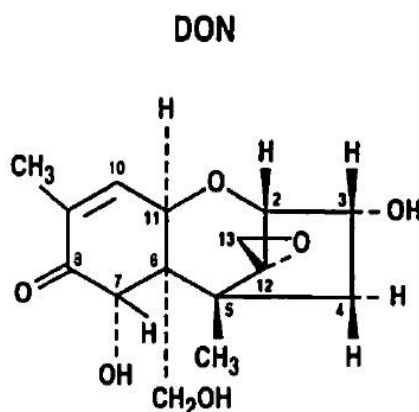
Mikotoksin deoksinivalenol (vomitoksin) je sekundarni metabolit plijesni *F. graminearum*, *F. culmorum* i drugih. Zastupljen je u žitaricama kao što su kukuruz, pšenica, ječam, zob, raž, riža. Uporabom kontaminiranih žitarica u proizvodnji hrane, DON dospijeva u prehrambene proizvode (kruh, slad, pivo itd). Može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla, kao što je meso i mlijeko (Cavret i Lecouer, 2006). Razine DON-a u prerađenim žitaricama (kruh, pekarski proizvodi, tjestenina) su značajno niže od onih u neprerađenim žitaricama i proizvodima od ne prerađenih žitarica (EFSA 2013).

Izoliran je iz oštećenog zrna ječma 1972. godine i najtoksičniji je pripadnik grupe trihotecena tipa B. Kod životinja, akutna izloženost DON-u izaziva smanjen unos hrane, krvavu dijareju, natjecanje stidnice i povraćanje, a kod kronične izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri (Pleadin i sur., 2015). Kod ljudi izaziva mučninu, povraćanje, (krvavu) dijareju, bol u trbuhu, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu.

U organizmu inhibira sintezu proteina što dovodi do rasta koncentracije aminokiseline triptofana i veće sinteze serotonina što je uzrok smanjenom unosu hrane. DON mijenja odgovor serumskih imunoglobulina IgA, koji se nalaze u sekreciji sluznica crijeva, gdje je glavna zaštita od antigena u hrani (Pleadin i sur., 2015).

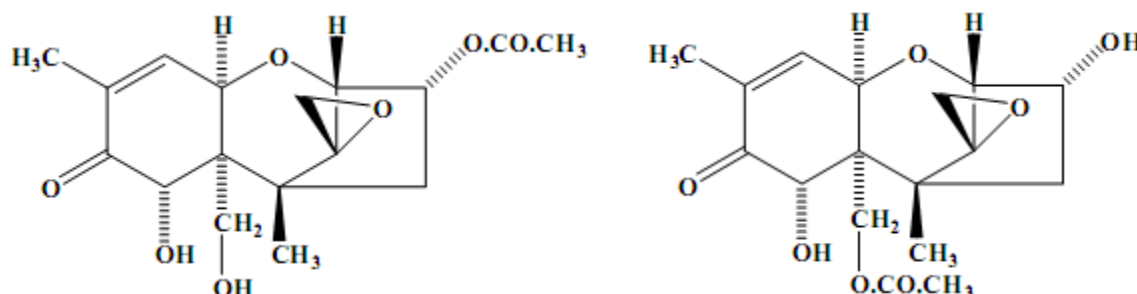
Prema FAO, 2001. procijenjeno je da dnevni unos DON-a u zemljama Afrike i Srednjeg Istoka iznosi 0,77-2,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase. U SAD-u je taj broj nešto manji 0,49 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase (US Department of Agriculture, 1996; Sudakin i sur., 2003). Prihvatljivi dnevni unos (TDI) DON-a za ljude postavljen je 2002. godine od strane Znanstvenog odbora za hranu (Scientific Committee on Food) te iznosi 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase po danu (EFSA, 2013). Kod životinja kronična doza DON-a se procjenjuje između 3,9 i 43,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase, a akutna doza između 11,6 i 137,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase (EFSA, 2013).

Kemijski naziv DON-a je 12,13-epoksi-3 α ,7 α ,15-trihidroksi trihotec-9-en-8-on, molekularne formule $C_{15}H_{20}O_6$ i kemijske strukture na **slici 5**. Vrlo je stabilan na visokim temperaturama (120°C) te tijekom prerade, mljevenja i skladištenja. Deoksinivalenol je sitan bezbojan prah koji je topljiv u polarnim otapalima (voda, etanol, metanol, etilacetat, acetonitril).



Slika 5 Kemijska struktura deoksinivalenola (DON)

Uz DON, na zrnu se nerijetko pojavljuju acilirani derivati DON-a, 3-AcDON i 15-AcDON te maskirani deoksinivalenol-3-glukozid. Imaju istu ili manju toksičnost od DON-a i smatralo se kako ne predstavljaju dodatni rizik (Pestka, 2007), iako novija istraživanja pokazuju da je 15-AcDON gotovo jednako toksičan kao i DON (EFSA, 2013). Modificirani oblici DON-a predstavljaju 10 do 20% ukupne količine DON-a. Kemijsko ime 3-AcDON-a je 3 α -acetoksi-7 α ,15-dihidroksi-12,13-epoksitrihotec-9-en-8-on, a 15-acetil deoksinivalenola 15 α -acetoksi-7 α ,15-dihidroksi-12,13-epoksitrihotec-9-en-8-on (**slika 6**). Molekulska formula im je $C_{17}H_{22}O_7$ zbog čega im je otežana detekcija na LC-MS/MS-u (Moss, 2004).



Slika 6 Kemijska struktura 3-AcDON-a i 15-AcDON-a (Moss, 2004)

2.4. PIVO

Prema pravilniku o pivu, pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pивske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanim vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura (NN 55/11).

U širem smislu, tehnologija piva se može podijeliti na dva nezavisna dijela: tehnologiju slada (prihvat i skladištenje žitarice, čišćenje, močenje, klijanje, sušenje i dorada uskladištenog slada) i tehnologiju piva. U užem smislu, tehnologija piva obuhvaća proizvodnju sladovine, glavno vrenje, naknadno vrenje mladog piva te dorada i punjenje piva u ambalažu (Marić i sur., 1995). Osnovna sirovina za proizvodnju piva je ječmeni slad koji se, nakon mljevenja, ukomljava s vodom u odgovarajućim omjerima. Tijekom ukomljavanja, enzimi prisutni u sladu razgrađuju škrob do jednostavnih šećera, odnosno enzimskom hidrolizom dolazi do prelaska netopljivih sastojaka slada u topljive sastojke, koji se odvajaju filtracijom. Nakon filtracije, dobivena sladovina se kuha uz dodatak hmelja pri čemu se ekstrahiraju aromatični sastojci hmelja. Tijekom kuhanja sladovina se uparava do odgovarajućeg udjela suhe tvari, inaktiviraju se enzimi, koaguliraju se bjelančevine te se sladovina sterilizira. U završnoj fazi sladovina se hladi, bistri i aerira. Ovako dobivena sladovina naciepljuje (inokulira) se čistom kulturom odgovarajućeg soja kvasca, koji provodi alkoholnu fermentaciju. Fermentacija sladovine obuhvaća glavno vrenje pri kojem se fermentabilni šećeri prevode u alkohol i CO₂ i naknadno vrenje mladog piva pri koje dolazi do potpunog previranja preostalih fermentabilnih šećera, obogaćivanja piva s CO₂, formiranja tvari arome i okusa (esteri, aldehidi, ketoni, organske kiseline, viši alkoholi) te bistrenje piva.

U završnom koraku proizvodnje piva (dorada i punjenje piva u ambalažu) provodi se biološka i koloidna stabilizacija piva, koje se potom filtrira i puni u prikladnu ambalažu.

Ovisno o kvascu korištenom u fermentaciji, pivo se može podijeliti na "piva donjeg vrenja", "pivo gornjeg vrenja", afričko pivo i "spontano prevrela piva" (Marić, 2009). Piva donjeg vrenja odnosno lager piva dobivaju se fermentacijom pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca *Saccharomyces uvarum*. Vrenje pivske sladovine započinje pri 6 do 8 °C te završava na 9 do 18 °C - "hladno vrenje" gdje se kvasac zadržava na dnu posude. Mlado pivo se nakon procesa vrenja odvaja od istaloženog kvasca te odležava jedan do tri ili više tjedna u ležnim tankovima pri 0 do 1 °C.

Za proizvodnju piva gornjeg vrenja ili "ale" koristi se čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Vrenje započinje pri 10 °C, a završava na 25 °C – "toplo vrenje" kada kvasac ispliva na površinu mladog piva (Marić, 2009). Nakon vrenja, kvasac se odvaja te pivo odležava i dozrijeva pri 20 °C, ali nešto kraće od lager piva.

Afričko pivo je manje poznata vrsta piva, koje se proizvodi od prosenog slada pomoću posebne vrste kvasca - *Schizomyces pombe*. Dok "spontano prevrela piva" su proizvod divljih sojeva kvasaca koji dospijevaju u sladovinu iz zraka ili sa zidova prostorija i posuda.

Industrijski dobivena piva su filtrirana i pasterizirana, dok su craft piva često nefiltrirana i/ili nepasterizirana te izražajnijih senzorskih karakteristika.

U Europu craft pivo je stiglo prije desetak godina iz Amerike. Prema američkoj definiciji, craft ili zanatske pivovare su privatno vlasništvo, malog su kapaciteta te se baziraju na tradicionalnom načinu proizvodnje piva, ponekad i s dodatkom netradicionalnih sastojaka što ih čini inovativnim i kreativnim. Danas u Americi alkoholna industrija kontrolira manje od 25% craft pivovara, koje proizvode oko 6 milijuna barela piva godišnje, što je oko 3% od ukupne prodaje piva u SAD-u (Brewers Association, 2016). Poseban okus craft piva potječe od tradicionalnih ili inovativnih pivskih sastojaka, dok aromatizirana pića na bazi slada se ne smatraju craft pivima. Craft pivarska industrija u 2011. godini predstavljala je 5,7% tržišnog udjela u ukupnom američkom tržištu, taj se udio do 2015. godine više nego udvostručio – 12% (Kell, 2016). Potražnja za punijim okusom craft piva i dalje raste, te je cilj postići 20% udjela na tržištu do 2020. godine (Kell, 2016). Proizvodnja i potražnja zanatskog (craft) piva u Hrvatskoj također bilježi rast.

U usporedbi s industrijskim pivom craft piva su više podložna mikrobnj kontaminaciji koja uzrokuje kvarenje (zamućenost, acidifikacija i proizvodnja neželjenih aromatskih spojeva) (Giovenzana i sur., 2014). Razlog tome je upravo česti izostanak pasterizacije i filtracije pri čemu kvasac zaostaje u konačnom proizvodnu (pivu). Takvo pivo ostaje „živo“ i s vremenom se razvija. Craft pivo zbog svoje osjetljivosti i podložnosti mikrobnj kontaminaciji zahtjeva kontrolu i upravljanje kakvoćom u cijelom procesu proizvodnje, a ne samo kod krajnjeg proizvoda. To se odnosi na sirovine (ječam, pšenica, hmelj itd) koje se koriste u procesu proizvodnje i na svaki pojedini korak procesa.

2.5. MIKOTOKSINI U PIVU

Mikotoksini dospijevaju u pivo uporabom kontaminiranih žitarica (ječam, pšenica, kukuruz, raž, itd) koje se koriste u proizvodnji piva. U kontaminiranim žitaricama se većinom nalaze mikotoksini koje sintetiziraju plijesni roda *Fusarium*, točnije trihoteceni. Osim putem žitarica, pivo se kontaminira mikotoksinima preko hmelja (sastojak koji daje karakterističnu aromu i gorčinu pivu) i ostataka klica i korjenčića koji se mogu naći u sladu. Tijekom proizvodnje slada, u fazi močenja ječma osiguravaju se optimalni uvjeti ne samo za klijanje zrna, nego i za rast plijesni i potencijalnu proizvodnju mikotoksina. Osim toga, kontaminacija ječma i slada plijesnima roda *Fusarium* odgovorna je za pojavu prekomjerna pjenjenja piva (eng. beer gushing), koje se pojavljuje nakon otvaranja boce ili limenke bez prethodne trešnje (Lowe i Arendt, 2004).

Najzastupljeniji rodovi plijesni koji utječu na pivski ječam su *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, koji proizvode širok raspon mikotoksina kao što su aflatoksini, OTA, DON i ZEA (Papadopoulou i sur., 1999).

Istraživanje koje su proveli Garda-Buffon i sur. (2010) pokazalo se kako toksini DON i T-2 blokiraju aktivnost enzima amilaze koji je važan tijekom procesa ukomljavanja u proizvodnji piva. Nadalje, DON i NIV inhibiraju rast i negativno utječu na vijabilnost kvasca. Tijekom procesa proizvodnje piva koncentracija mikotoksina se uglavnom smanjuje, ali vodotopljivi i termostabilni mikotoksini kao npr. DON i ostali trihoteceni grupe B mogu preživjeti proces proizvodnje piva i zaostati u pivu, što za posljedicu ima devijacije u boji piva i pojavu prekomjerna pjenjenja piva (Wolf-Hall i Schwarz, 2002). Dobra vodotopljivost trihotecena u vodi omogućava im prelazak iz sirovina u sladovinu i pivo (Trucksess i sur., 2001).

Istraživanju Inoue i sur., (2013) navode kako nakon ukomljavanja slada dolazi do smanjenja koncentracije aflatoksina, ohratoksina A, patulina i zearalenona na manje od 20% od početne koncentracije u sladu. S druge strane, došlo je do povećanja koncentracija NIV, DON i HT-2 za više od 50% od njihove početne koncentracije u sladu. Također je uočeno da tijekom fermentacije dolazi do potpune enzimske razgradnje ZEA i PAT, pri čemu se oni više ne detektiraju u sladovini, dok se aflatoksini (AFB₂, AFB₁), OTA, HT-2 i T-2 se nalaze u vrlo malim količinama.

Provedena su brojna istraživanja pojavnosti DON-a u sladu i pivu. (**tablica 1**). Istraživanje Schwarz-a i suradnika (1995) utvrdilo je da 80 – 93% od početne koncentracije DON-a u sladu završava u pivu. Tijekom procesa slađenja koncentracija DON-a u zrnju se mijenjala, pri čemu je došlo do njena povećanja tijekom faze močenja zrna, dok se smanjivala tijekom klijanja zrna i u ranoj fazi sušenja. Osim toga, istraživanje koje su proveli Lancova i sur. (2008) pokazalo je kako su koncentracije praćenih mikotoksina (trihotecena) u sladu bile veće u usporedbi s početnim koncentracijama u ječmu. Sudbina ZEA se u procesu proizvodnje piva slična je DON-u, pri čemu ZEA zbog slabije vodotopljivosti i termostabilnosti u pivo prelazi u manjem omjeru (51%) .

Tablica 1. Pojavnost DON-a u različitim zemljama (Papadopoulou-Bouraoui i sur., 2004)

Zemlja	Učestalost/ DON/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Srednja vrijednost/ DON/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Raspon
Austrija	25/33	10,2	4,5–29,5
Belgija	47/47	18,1	4,1–56,7
Cipar	5/6	8	4,0–12,2
Češka	17/17	21,5	4,6–55,3
Danska	9/9	19,9	6,0–47,1
Francuska	24/27	11	4,1–30,2
Finska	3/4	7,4	5,2–10,6
Njemačka	45/46	4,7	4,0–40,5
Grčka	4/4	17	16,2–16,8
Mađarska	2/2	10,8	10,5–11,1
Irska	2/2	8,7	7,7–9,6
Italija	16/16	10,5	5,0–29,4
Nizozemska	3/4	8	5,9–9,7
Norveška	3/4	7,7	6,0–9,9
Poljska	10/10	17,2	5,0–32,9
Švedska	4/7	5,1	5,1–14,6
Slovačka	9/12	13,5	5,5–36,9
Španjolska	6/13	7,3	5,1–12,2
Velika Britanija	25/33	10,9	4,1–30,8

Vrlo rijetko u pivu se osim trihotecena, može pronaći u tragovima i ohratoksin A (OTA), kojeg proizvodi plijesan *Aspergillus ochraceus*, karakteristična vrsta za tropske predjele. U umjerenim i hladnijim klimatskim područjima plijesan odgovorna za produkciju ohratoksina A je *Penicillium verrucosum* (Noots 1998).

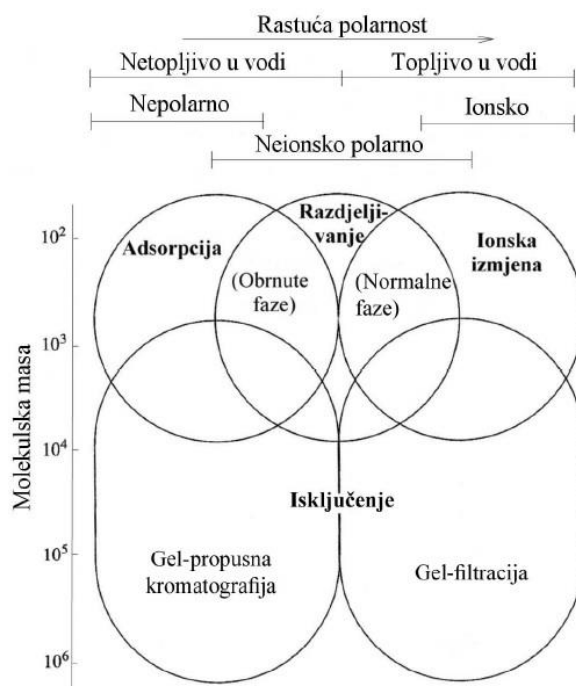
Prilikom određivanja mikotoksina u sladovini i pivu, moguće je dobiti prividno manje početne koncentracije mikotoksina. Razlog tome je reakcija mikotoksina s drugim spojevima (šećeri, aminokiseline ili sulfatne grupe) koji se mogu naći u žitaricama, pri čemu nastaju „maskirani“ mikotoksini - DON-3-glukozid i ZEA-4-glukozid. Također se dio mikotoksina može vezati i za staničnu stijenku kvasaca koja se i koristi u procesima detoksifikacije mikotoksina (Klapec i Šarkanj 2016).

Istraživanja ovisnosti volumnog udjela alkohola u pivu i koncentracije DON-a i njegovih konjugata pokazala su da su u pivima s većim sadržajem alkohola primijećene i veće koncentracije DON-a (Kostelanska i sur., 2009; Papadopoulou-Bouraoui i sur., 2004; Varga i sur., 2013). Kostelanska i sur. (2009) kao razlog tome navode veći udjel suhe tvari (ekstrakta) u sladovini pri proizvodnji piva s većim udjelom alkohola (jačih piva) uporabu veće količine. Osim pozitivne korelacije koncentracije DON-a i udjela alkohola, istraživanje koje su proveli Kostelanska i sur. (2009) pokazalo je da piva dobivena od slada prženog na višim temperaturama (tamna i crna piva) sadrže veće koncentracije DON-a u odnosu na svijetla piva.

2.6. ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA - TANDEMSKA MASENA SPEKTROMETRIJA (LC-MS/MS)

Tekućinska kromatografija (LC) analitička je tehnika koja se koristi za razdvajanje više komponenata u uzorku bazirajući se na međudjelovanju analita različitih fizikalnih i kemijskih svojstava između mobilne faze (eluenta) i stacionarne faze (sadržaj kolone). Prikladna je za odjeljivanje bioloških aktivnih spojeva, termički nestabilnih spojeva, spojeva male i velike molekularne mase te spojeva koji se mogu prevesti u plinovito stanje bez njihove degradacije.

S obzirom na svojstva mobilne i stacionarne faze razlikuju se razdjelna kromatografija normalnih (stacionarna faza visoko polarna, mobilna faza nepolarna) i obrnutih faza (nepolarna stacionarna faza, polarna mobilna faza), ionsko-izmjenjivačka (nabijene čestice stacionarne faze privlače suprotno nabijene čestice), kromatografija isključenjem (razdvajanje prema razlici u veličini i/ili obliku molekula ili naboju), afinitetna kromatografija (razdvajanje prema specifičnim interakcijama molekula analita i molekula vezanih za mobilnu fazu) i adsorpcijska kromatografija (adsorpcija spojeva na površinu adsorbensa) (**slika 7**).



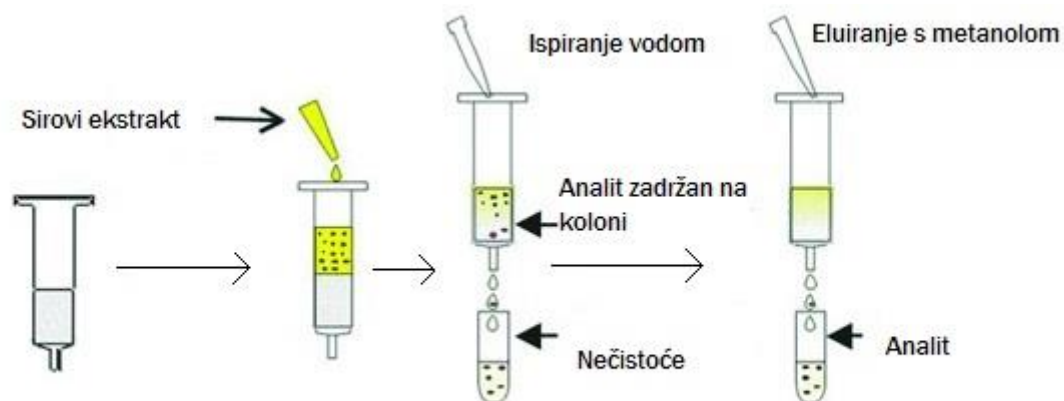
Slika 7 Tekućinska kromatografija

Masena spektrometrija (MS) analitička je tehnika kojom se nabijeni atomi ili molekule separiraju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z ; bezdimenzijska veličina). Masenom se spektrometrijom ionizira atom ili čestice molekula iz uzorka zatim razdjeljuje te detektira. Primjena MS je široka, koristi se kod kvalitativnih analiza (kemijski sastav ili molekulsku masu), kvantitativnih analiza, izotopnih analiza i drugo. Uzorak se u MS uvodi na direktno, indirektno ili preko separatora u vezanim sustavima. MS u vezanim sustavima ima svrhu detektora, najčešće kod tekućinske kromatografije (LC-MS, LC-MS/MS) i plinske kromatografije (GC-MS, GC-MS/MS). Kombinacijom dva koraka masene spektrometrije s fazom fragmentacije između definirana je tandem masena spektrometrija (MS/MS). Da bi se uzorak mogao analizirati na MS-u, nakon odvajanja u tekućinskoj kromatografiji potrebna je njegova prethodna ionizacija. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita ionizacija uzorka se provodi pri atmosferskom tlaku ili vakuumu. Od ionizacijskih tehnika kod atmosferskog tlaka (API) koriste se ionizacija elektroraspršivanjem (ESI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI), svjetlosna ionizacija pri atmosferskom tlaku (APPI), ionizacija laserom pri atmosferskom tlaku (APLI), ionizacija soničnim sprejem (SSI), bombardiranje brzim atomima (FAB), laserska desorptivna ionizacija potpomognuta matriksom (MALDI), ionizacija poljem (FI), te desorpcija poljem (FD) (Polletini, 2006). Kombinacija tekućinske kromatografije s MS/MS-om osigurava „najidealnije“ odvajanje i identifikaciju analita iz smjese što se u tom stupnju ne može postići korištenjem samo jedne od navedenih metoda (Varga, 2010).

Princip rada LC-MS/MS-a i pročišćavanje uzorka

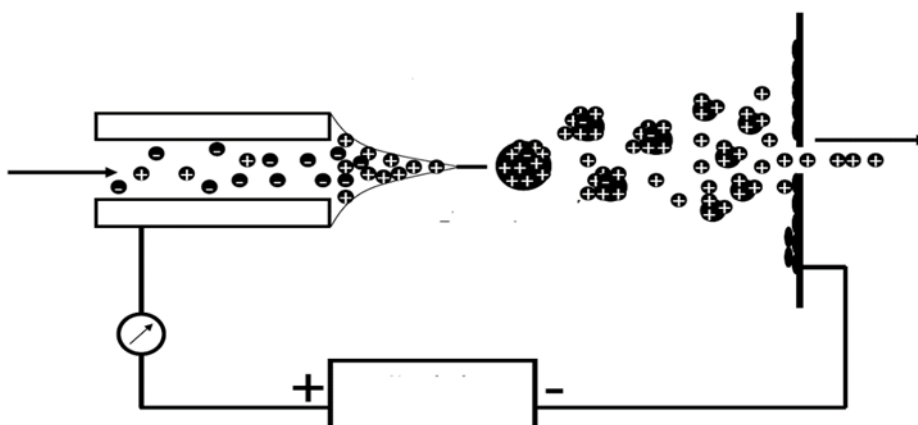
Prije određivanja mikotoksina u uzorku pomoću LC-MS/MS-a, potrebno je pravilo uzeti uzorak (uzorkovanje), ekstrahirati ga te pročistiti. Struktura mikotoksina određuje izbor ekstrakcijske metode i otapala za izolaciju mikotoksina iz uzorka. Aflatoksin je hidrofoban pa se za ekstrakciju koriste napolarna ili slabo polarna otapala (Turner i sur., 2009). Nakon ekstrakcije uzorak je potrebno pročistiti od ostalih komponenata jednake topljivosti, koje su zaostale u otapalu nakon ekstrakcije i koje bi mogle dati krive rezultate (šumovi i lažno pozitivni ili povišeni rezultati, kao i redukcija matriksa koji smanjuje efikasnost ionizacije te daje nepravilno niske rezultate). Da bi se to spriječilo koriste se različiti načini uklanjanja koekstrahiranog matriksa zbog poboljšanja ionskog signala i odnosa signala prema šumu (Annesley, 2003). Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE – eng. solid phase extraction) je najčešći način uklanjanja koekstrahiranog matriksa u uzorku. SPE kolone ovisno o mehanizmu djelovanja sadrže: protutijela (IAC – imunoafinitetne kolone), adsorbensi (normalna ili reverzna faza, NP- ili RP-SPE), ionski izmjenjivači (IEC), molekularno utisnuti polimeri (MIP), ili aptameri (APM) (Shephard, 2009).

Imunoafinitetne kolone (IAC) sadrže čvrsti nosač kao što je agarozni gel u fosfatnom puferu na kojem je pričvršćeno protutijelo za analit (mikotoksin). Propuštanjem tekućeg uzorka kroz IAC kolonu mikotoksin se veže za protutijelo na čvrstom nosaču. Potom se radi uklanjanja nečistoća kolona ispiru vodom, a zatim ispiru otapalom (metanolom) koji denaturira protutijela te uzrokuje otpuštanje mikotoksina u otopinu metanola (**slika 8**). Ovom metodom se u krakom vremenu pročišćavanja uzorka dobije dobra preciznost, točnost i osjetljivost za daljnje analize. Jedini nedostatak IAC kolona je njihova visoka cijena i jednokratna uporaba zbog denaturacije proteina.



Slika 8 Pročišćavanje imunoafinitetnim kolonama (Prilagođeno iz Romer Labs, 2016)

Nakon pročišćavanja uzorka potrebno je ionizirati uzorak te ga time prevesti iz tekuće u plinovitu fazu. Ionizacija neutralnih molekula predstavlja njihovo prevođenje iz krutog ili tekućeg stanja u plinovito (desorpcija), a svrha ionizacije je lakše manipuliranje ionima nego neutralnim molekulama (Ashcroft, 1997). Najčešća ionizacija koja se koristi zbog usklađenosti sa svim masenim analizatorima je ionizacija elektroraspršivanjem (ESI) pri atmosferskom tlaku i optimalnoj temperaturi iznad 100 °C u struji dušika. U ionizator kroz kapilaru odnosno elektrodu napona 2- 5 kV ulazi mobilna faza zajedno sa analitom gdje se raspršuje u Taylorovom konusu na vrlo sitne nabijene kapljice koje se smanjuju otparavanjem otapala pri čemu se koncentrira analit. Otparavanje eluenta s analita se odvija zbog razlike u tlaku između raspršivača i odvajača te sve do Rayleighov limita gdje je elektrostatsko odbijanje kapljice jače od površinske napetosti. Daljnje smanjenje nabijenih kapljica se odvija Coulombovom fisijom čime kapljice sadrže manje otapala i naboja od prvobitne kapljice (**slika 9**).



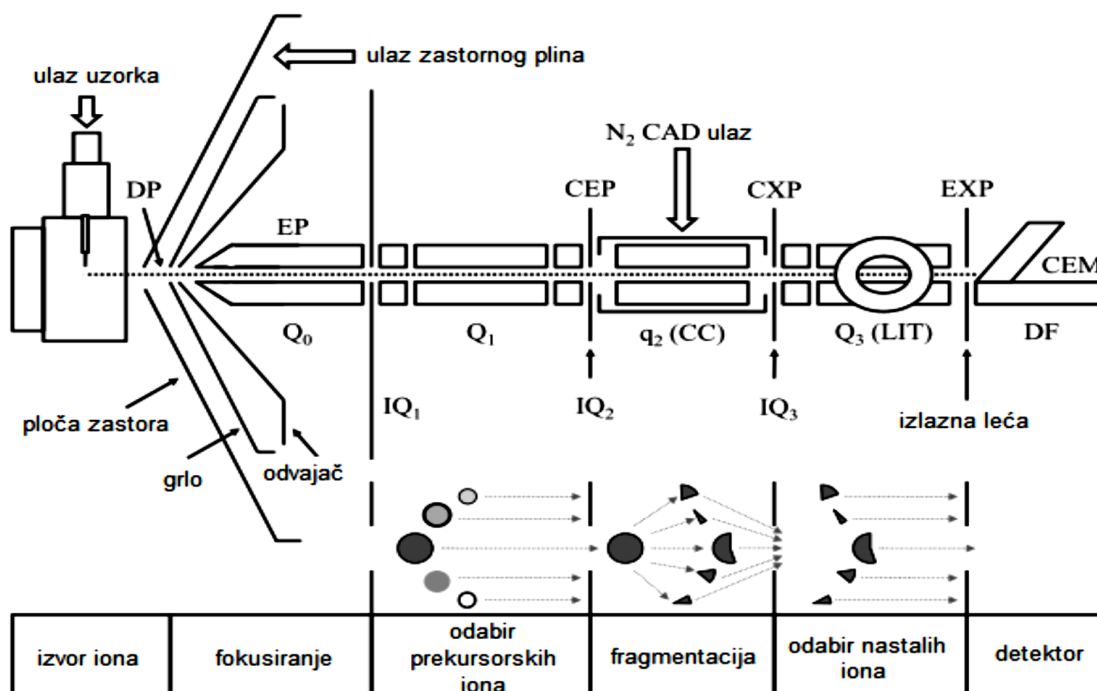
Slika 9 Shematski prikaz ESI ionizatora (Marquet i Lacahatre, 1999)

Nakon ionizacije uzorka, razdvojeni ioni ubrzavaju se i kreću prema analizatora mase u kojem se pomoću elektromagnetskog polja odjeljuju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Odvojeni ioni putuju prema detektoru gdje se dobivene informacije bilježe pomoću računala i sređuju preko odgovarajućeg softvera.

Od masenih analizator koriste se sektorski, ionske stupice, time-of-flight (TOF) uređaji, kvadrupoli, FT ICR (eng. Fourier transform ion cyclotron resonance) maseni analizatori i uređaji s kombiniranim analizatorima mase. Uređaji koji se sastoje od kombiniranih analizatora ujedinjuju prednosti svakog od kombiniranih analizatora, a dijele se na trostruke kvadrupole, Q-Trap, qTOF, kvadropol ionska zamka-orbitrap i kvadropol ionska zamka-FT (Cutillas i Timms, 2010).

Trostruki kvadropol sastoji se od četiri paralelne elektrode valjkastog oblika od kojih nasuprotne imaju isti naboj. Elektrode brzo i periodički mijenjaju svoj naboj te ulaskom iona u kvadropol (Q_0) privlači ga onaj par elektroda sa suprotnim nabojem od njegovog, što uzrokuje spiralno kretanje iona prema kraju kvadropola. Kod trostrukog kvadropola sa i bez ionske stupice primjenjuju nekoliko modova za skeniranje, a to su Q_1 skeniranje, Q_1 višestruko ionsko skeniranje, SRM skeniranje i dr. (Varga, 2010).

SRM mod za skeniranje sadrži MRM (engl. – Multiple Reaction Monitoring) tip skeniranja (slika 10) kod kojeg se pomoću prvog kvadropola (Q_1) odabire prekursorski ion analita koji se propušta dalje, a ostali ioni se spaljuju na elektrodama. Drugi kvadropolu (Q_2) ima svrhu korozijske ćelije (CC) kod koje dolazi do sudara iona i molekula korozijskih plinova (He, N₂, Ar; najčešće N₂) pri čemu nastaju fragmenti iona prekursora. Nastanak fragmentiranih iona ovisi o jakosti veze, stabilnosti produkata, vremenu između stvaranja iona i njihove detekcije itd. Fragmenti se odvođe iz korozijske ćelije naponom koji se nalazi na njenom izlaznom dijelu (CXP – eng. cell exit potential). U posljednjem kvadropolu (Q_3) odvajaju se fragmenti iona na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). Daljnjim prolaskom, ioni udaraju u površinu kontinuiranog množitelja elektrona (CEM – eng. Continuous Electron Multiplier) te šalju do detektora pomoću deflektora (DF) gdje se pretvaraju u brojeve udaraca po sekundi (cps) za određeni omjer mase i naboja. Područje mase koje se mjeri podesi se na nekoliko m/z vrijednosti time se vrijeme mjerenja skraćuje i dobivaju se precizniji rezultati (Varga, 2010).



Slika 10 Princip rada MS/MS uređaja (prilagođeno iz Varga, 2010)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je pomoću LC-MS/MS-a usporediti pojavnost mikotoksina u komercijalnim pivima hrvatskih industrijskih i craft pivovara.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema standarda

Pri određivanju mikotoksina pripremljeni standardi su spravljani od osnovnog standarda (MIX 4) u kojem se nalaze DON, NIV, 3-AcDON, ZEA, T-2, HT-2, DAS i FUS-X. Koncentracije standarda se kreću od 10 do 500 ppb i pripremaju se razrjeđenjem osnovnog standarda s otopinom za razrjeđivanje (acetonitril:voda:octena kiselina; 20:79:1). Standardi su sljedeći:

- STD 500: 35 µL osnovnog standarda + 665 µL otopine za razrjeđivanje
- STD 300: 15 µL STD 500 + 485 µL otopine za razrjeđivanje
- STD 100: 100 µL STD 500 + 400 µL otopine za razrjeđivanje
- STD 50: 50 µL STD 500 + 450 µL otopine za razrjeđivanje
- STD 30: 30 µL STD 500 + 470 µL otopine za razrjeđivanje
- STD 10: 10 µL STD 500 + 490 µL otopine za razrjeđivanje

Za pripremu standarda pri određivanju DON-a korišten je osnovni standard DON-a biopure (Romerlabs, Austrija), MIX 4 sa koncentracijom DON-a od 10 ppm. Željene koncentracije se dobivaju razrjeđenjem otopine standarda DON-a (STD 100-5000) sa otopinom za razrjeđivanje - (acetonitril:voda:octena kiselina; 20:79:1). Pripremljeni standardi su sljedeći:

- STD 5000: 1250 μ L osnovnog standarda + 1250 μ L otopine za razrjeđivanje
- STD 3000: 300 μ L STD 5000 + 700 μ L otopine za razrjeđivanje
- STD 1000: 100 μ L STD 5000 + 900 μ L otopine za razrjeđivanje
- STD 500: 50 μ L STD 5000 + 950 μ L otopine za razrjeđivanje
- STD 300: 30 μ L STD 5000 + 970 μ L otopine za razrjeđivanje
- STD 100: 10 μ L STD 5000 + 990 μ L otopine za razrjeđivanje

3.2.2. Uzorkovanje

Ispitano je trideset i četiri uzorka piva od kojih je devetnaest iz hrvatskih craft pivovara te petnaest iz industrijskih pivovara (**tablica 2**). Svi uzorci piva su prije uzorkovanja dekarbonizirani u struji dušika, u svrhu uklanjanja ugljikovog (IV) oksida. Nakon dekarbonizacije piva, uzeti su reprezentativni uzorci po 25 mL od svakog piva i preneseni u plastične epruvete od 50 mL te su zamrznuti i spremljeni na čuvanje do analize.

Tablica 2. Prikaz ispitanih craft piva

Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Sirovine	Opis uzorka	Volumni udjel alkohola / %	Udjel ekstrakta / %	pH
2	Craft	Pšenično	Slad, hmelj, pšenica	Nefiltrirano, pasterizirano	4,6	13	4,19
31	Craft	Pšenično	Slad, hmelj, pšenica	Nefiltrirano, pasterizirano	4,6	-	-
14	Craft	Crveno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,20
3	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	12	4,52
5	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	5,3	-	4,41
11	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,5	-	4,42
12	Craft	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano	5	11,4	4,24
13	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,17
15	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	4,5	12	4,15
16	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,1	-	4,20
32	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	3,9	-
29	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,30
6	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	6,5	-	4,39
17	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano	6	-	4,31
1	Craft	Tamno, jako	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	7,5	15	4,25
30	Craft	Tamno, jako	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	7,5	-	-
4	Craft	Crno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	4	13	4,38
33	Craft	Crno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	4	-	-
34	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	-	-	4,35

Tablica 3. Prikaz ispitanih industrijskih piva

Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Sirovine	Opis uzorka	Volumni udjel alkohola / %	Udjel ekstrakta / %	pH
24	Industrijska	Svijetlo, pšenično	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,4	11,6	4,20
7	Industrijska	Crveno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,8	4,21
8	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,5	4,43
9	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6,3	15	4,54
10	Industrijska	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano, pasterizirano	4	9,8	4,10
18	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,5	11,8	4,21
20	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,7	11,8	4,27
21	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,2	11	4,13
23	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,6	4,23
26	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11	4,14
27	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,4	4,21
19	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,8	4,28
22	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	7,3	17,75	4,33
25	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6	14,5	4,31
28	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,5	12,5	4,28

3.2.3. *Analiza mikotoksina*

U plastične epruvete od 50 mL odpipetirano je 15 mL odmrznutog dekarboniziranog piva i 15 mL acetonitrila te je smjesa homogenizirana 5 sekundi na mješaču (vortex). Uzorci su prije propuštanja preko SPE kolona filtrirani preko filter papira sa staklenim vlaknima. Od svakog filtriranog uzorka, propušteno je 15 mL preko SPE kolone (Romerlabs SPE kolona MycoSepR 226 AflaZON+) pri čemu su sve nečistoće zadržane u punilu kolone, a mikotoksini propušteni. 6 mL pročišćenog uzorka s mikotoksinima je otpareno u struji dušika. Nakon otparivanja, uzorak je rekonstituiran u 400 µL mobilne faze te injektiran u LC-MS/MS sustav.

Limit detekcije (LOD) mikotoksina koji su određivani iznosi 50 ppb.

Analiza deoksinivalenola

Dekarbonizirani uzorci piva su odmrznuti pri sobnoj temperaturi i filtrirani preko filter papira sa staklenim vlaknima kako bi se uklonile nečistoće. Od svakog filtriranog uzorka odpipetirano je po 10 mL i propušteno kroz imunoafinitetne kolone (AflaTest, Vicam) pri čemu se DON vezao za protutijela na čvrstom nosaču kolone, a ostatak nečistoća je prošao kroz kolonu. Uzorci piva prolaze IAC kolonom gravitacijskom silom ili uz pomoć vakuumpumpe. Nakon propuštanja uzorka piva, kolona je isprana sa 25 mL vode radi uklanjanja zaostalih nečistoća u koloni. Zatim je izvršeno eluiranje s 2 mL metanola, koji je denaturao protutijela čime se vezani DON oslobodio u otopinu metanola. Nakon ispiranja kolona, metanol je iz dobivene otopine uklonjen otparivanjem pod vakuumom pri 70 °C. Dobiveni uzorak s čistim DON-om je potom rekonstituiran s 400 µL mobilne faze (metanol) te je injektiran u LC-MS/MS sustav.

Prije mjerenja na LC-MS/MS-u izvršena je kalibracija uporabom stanadarda poznate koncentracije DON-a od 100 do 5000 ppb. Nakon kalibracije, izmjerena je koncentracija DON-a u pripremljenim uzorcima. Dobiveni rezultati su prikazani grafički radi izračunavanja linearnosti metode. Kriterij linearnosti je koeficijent determinacije (R^2) koji je veći od 0,99.

Propuštanjem otopine poznate koncentracije određeno je iskorištenje (recovery), koje je za DON iznosilo 100%.

3.2.4. *Uvjeti i instrumenti*

Analiza prisutnosti mikotoksina u pivu je izvođena na sustavu za tekućinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom: Applied BioSystems/MDS SCIEX, API 2000, s trostrukim kvadropolom. Sustav sadrži HPLC binarne pumpe PerkinElmer s vakuum otplinjačem i autosampler koji je spojen s AB SCIEX-ovim API 2000 MS/MS detektorom. Ionizacija uzoraka je izvođena elektrosprejnim izvorom (ESI). Dobiveni podaci su obrađeni pomoću Analyst 1.4.2 softvera.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 4. Koncentracije (ng mL^{-1}) DON-a u uzorcima piva (<LOD; ispod limita detekcije)

	Broj uzoraka piva	Koncentracija DON-a u uzorcima piva/ ng mL^{-1}
Ukupni broj uzoraka	34 (100%)	-
Nekontaminirani uzorci	12 (35%)	<LOD
Uzorci kontaminirani DON-om	22 (65%)	4,12-18,16

Tablica 5. Koncentracije DON-a prisutne u svijetlim, crvenim, pšeničnim, crnim i tamnim/tamnim jakim pivima

Vrsta piva	Ukupan broj ispitanih uzoraka	Broj uzoraka u kojima je prisutan DON	Koncentracija DON-a/ ng mL^{-1}
Svijetlo	17	13	4,12 – 18,16
Crveno	2	1	4,12
Pšenično	3	1	4,16
Crno	6	3	4,12 – 5,92
Tamno/tamno jako	6	3	4,12 – 11,68

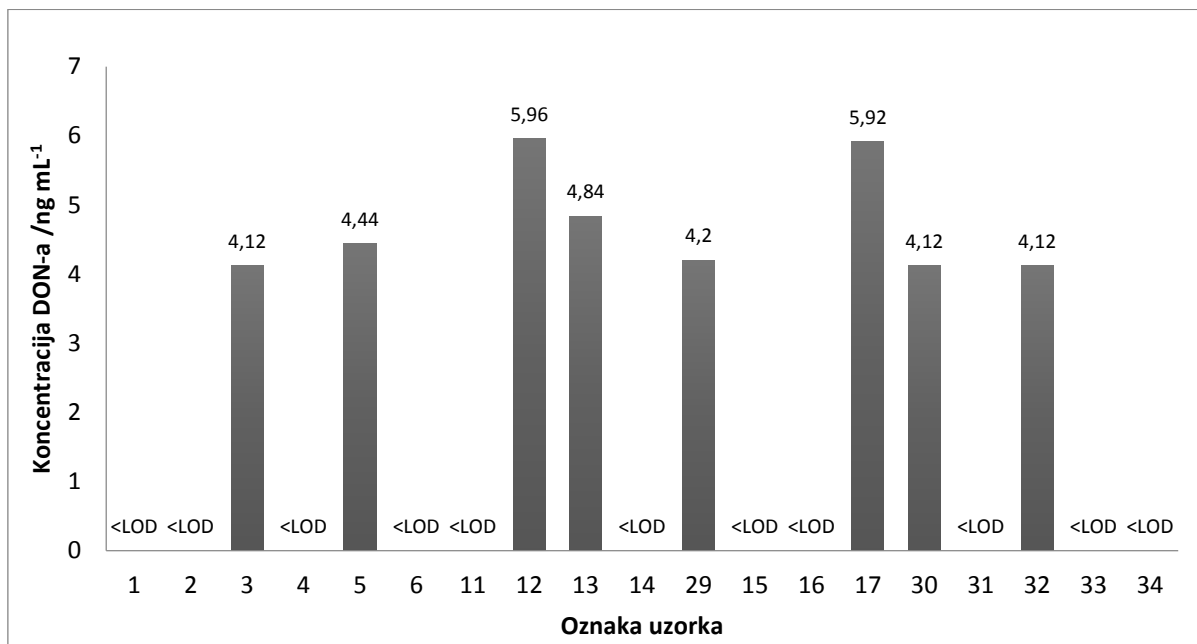
Tablica 6. Koncentracije (ng mL^{-1}) DON-a u ispitanim *craft pivima* (<LOD; ispod limita detekcije)

Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Sirovine	Opis uzorka	Volumni udjel alkohola / %	Udjel ekstrakta / %	pH	Koncentracija DON-a / ng mL^{-1}
2	Craft	Pšenično	Slad, hmelj, pšenica	Nefiltrirano, pasterizirano	4,6	13	4,19	4,6
31	Craft	Pšenično	Slad, hmelj, pšenica	Nefiltrirano, pasterizirano	4,6	-	-	<LOD
14	Craft	Crveno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,20	<LOD
3	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	12	4,52	4,12
5	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	5,3	-	4,41	4,44
11	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,5	-	4,42	<LOD
12	Craft	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano	5	11,4	4,24	5,96
13	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,17	4,84
15	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	4,5	12	4,15	<LOD
16	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,1	-	4,20	<LOD
32	Craft	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	3,9	-	4,12
29	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,30	4,2
6	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	6,5	-	4,39	<LOD
17	Craft	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano	6	-	4,31	5,92
1	Craft	Tamno, jako	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	7,5	15	4,25	4,12
30	Craft	Tamno, jako	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	7,5	-	-	4,12
4	Craft	Crno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	4	13	4,38	<LOD
33	Craft	Crno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	4	-	-	<LOD
34	Craft	Tamno	Slad, hmelj	nefiltrirano, nepasterizirano	-	-	4,35	<LOD

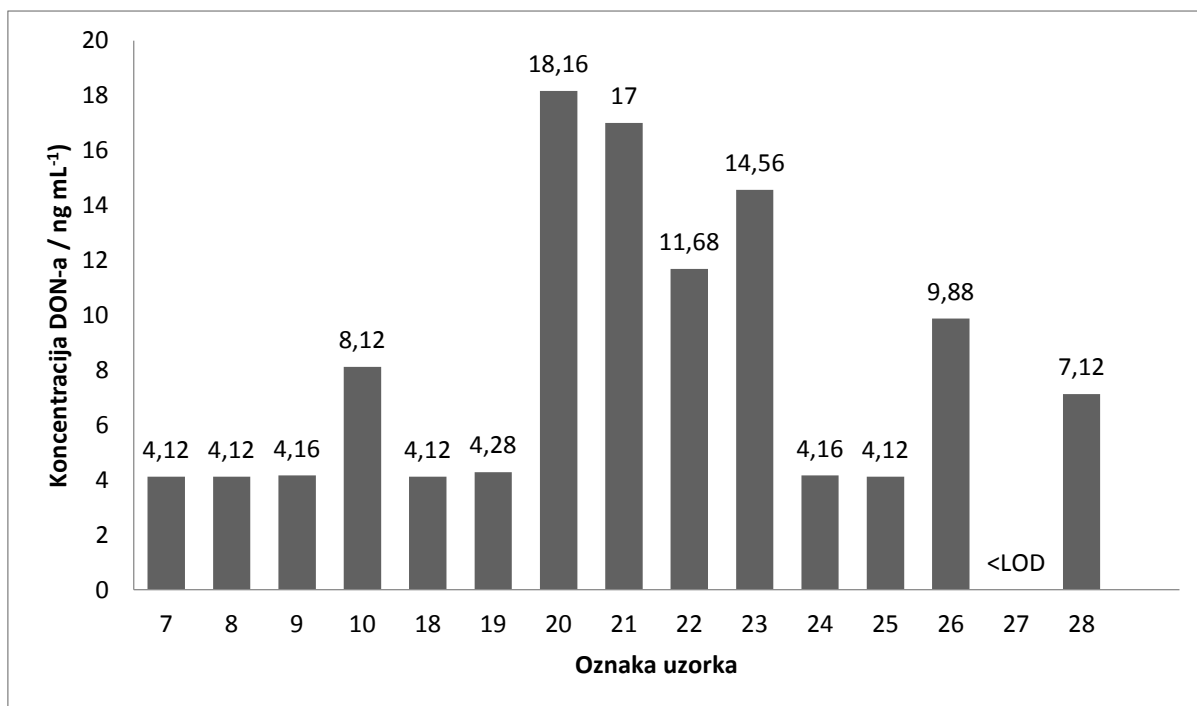
Tablica 7. Koncentracije (ng mL⁻¹) DON-a u ispitanim *industrijskim pivima* (<LOD; ispod limita detekcije)

Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Sirovine	Opis uzorka	Volumni udjel alkohola / %	Udjel ekstrakta / %	pH	Koncentracija DON-a /ng mL ⁻¹
24	Industrijska	Svijetlo, pšenično	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,4	11,6	4,20	4,16
7	Industrijska	Crveno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,8	4,21	4,8
8	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,5	4,43	4,8
9	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6,3	15	4,54	4,16
10	Industrijska	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano, pasterizirano	4	9,8	4,10	8,12
18	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,5	11,8	4,21	4,12
20	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,7	11,8	4,27	18,16
21	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,2	11	4,13	17
23	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,6	4,23	14,56
26	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11	4,14	9,88
27	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,4	4,21	<LOD
19	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,8	4,28	4,28
22	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	7,3	17,75	4,33	11,68
25	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6	14,5	4,31	4,12
28	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,5	12,5	4,28	7,12

Slika 11 Grafički prikaz detektirane koncentracije (ng mL^{-1}) DON-a u ispitanim craft pivima (<LOD; ispod limita detekcije)



Slika 12 Grafički prikaz detektirane koncentracije (ng mL^{-1}) DON-a u ispitanim industrijskim pivima (<LOD; ispod limita detekcije)



Analizirani mikotoksini (DON, NIV, 3-AcDON, ZEA, T-2, HT-2, DAS i FUS-X) nisu detektirani, zbog vrlo malih koncentracija koje su bile manje od limita detekcije (50 ppb). Uzorci su zatim koncentrirani propuštanjem kroz IAC kolonu pri čemu se limit detekcije smanjio te je detektirana prisutnost DON-a u 22 uzorka od ukupno 34 uzorka piva.

DON je vrlo stabilan prilikom procesa proizvodnje piva te se ekstrahira iz početne sirovine u krajnji proizvod – pivo. Od ukupno 34 (100%) ispitanih uzoraka piva (**tablica 4**) u 22 uzorka (65%) je detektirana prisutnost DON-a, a u 12 uzoraka (35%) je koncentracija manja od limita detekcije. Najveća koncentracija DON-a iznosila je $18,16 \text{ ng mL}^{-1}$ i određena je u uzorku 20 (industrijsko svijetlo pivo), dok je najmanja koncentracija određena u uzorcima 3 (svijetlo craft pivo), 7 (crveno industrijsko pivo), 8 (svijetlo industrijsko pivo), 18 (svijetlo industrijsko pivo), 25 (crno industrijsko pivo), 30 (tamno, jako craft pivo) i 2 (svijetlo craft pivo) i iznosila je $4,12 \text{ ng mL}^{-1}$.

U usporedbi s industrijskim pivima, u craft pivima određene su manje koncentracije DON-a. Od ukupno devetnaest uzoraka (100%) craft piva DON je detektiran u osam uzoraka (42,12%) (**tablica 6, slika 11**): svijetlo pivo – uzorak 3 ($4,12 \text{ ng mL}^{-1}$), svijetlo pivo – uzorak 5 ($4,44 \text{ ng mL}^{-1}$), svijetlo pivo – uzorak 12 ($5,96 \text{ ng mL}^{-1}$), tamno pivo – uzorak 29 ($4,2 \text{ ng mL}^{-1}$), svijetlo pivo – uzorak 13 ($4,84 \text{ ng mL}^{-1}$), tamno pivo – uzorak 17 ($5,95 \text{ ng mL}^{-1}$), tamno, jako pivo – uzorak 30 ($4,12 \text{ ng mL}^{-1}$) i svijetlo pivo – uzorak 32 ($4,12 \text{ ng mL}^{-1}$).

Najveća koncentracija DON-a u određena u industrijskim pivima iznosila je $18,16 \text{ ng mL}^{-1}$ (uzorak 10 - svijetlo pivo). Iz **tablice 7** i **slike 12** vidljivo je kako je koncentracija DON-a manja od limita detekcije u samo jednom uzorku od ukupno šesnaest uzoraka industrijskih piva, odnosno u petnaest uzorka (93,75%) je koncentracija DON-a iznad limita detekcije.

Prosječna vrijednost DON-a u 22 uzorka u kojima je DON prisutan iznosi $7,18 \text{ ng mL}^{-1}$, što je u skladu s literaturnim podacima. Prosječna vrijednost DON-a u istraživanju koje su proveli Varga i sur. (2013) na 374 uzorka piva iznosi $13,6 \text{ ng mL}^{-1}$, a u istraživanju Kostelanske i sur. (2009) ta vrijednost iznosi $6,6 \text{ ng mL}^{-1}$.

Koncentracija DON-a u pivu povećava se s povećanjem stupnja kontaminacije slada. U fazi sušenja zrna pri temperaturama višim od 50°C i vlažnosti manjoj od 5% dolazi do smanjena koncentracije plijesni roda *Fusarium* u sladu, ali i do povećanja sinteze DON-a (Smith i Moss, 1985; Boeira i sur., 2002).

DON zbog svoje termostabilnosti i dobre topljivosti u vodi preživljava proces proizvodnje piva i zaostaje u konačnom proizvodu. Tijekom ukomljavanja DON se ekstrahira iz slada u sladovinu. Neissen (1993) navodi kako se koncentracija DON-a prilikom ukomljavanja povećava, a uzrok tome je oslobađanje DON-a u sladovinu iz proteinskih koagulanata. Veća koncentracija DON-a u pivu može se objasniti povećanjem udjela vode u kojoj je otopljen DON uslijed smanjenja udjela suhe tvari nakon fermentacije u usporedbi s udjelom suhe tvari u sladu. Dok će postotak prelaska DON-a iz sladovine u pivo biti manji zbog adsorpcije DON-a na kvasac ili ekstracelularnog metabolizma kvasca što su uočili Boeira i suradnici (1999).

Tijekom proizvodnje industrijskih piva, pivo nakon fermentacije se filtrira radi uklanjanja ostataka kvasca te se pasterizira zbog produljenja roka trajanja. Proizvodnja craft piva često ne uključuje filtraciju i pasterizaciju, što ovo pivo čini mikrobiološki nestabilnijim. Zbog veće mogućnosti mikrobne kontaminacije pri proizvodnji craft piva, u ovim se pivovarama mora posvetiti posebna pažnja kontroli kakvoće svih sirovina, kao i svake pojedine proizvodne faze. Upotreba kvalitetnih i mikrobiološki ispravnih sirovina vjerojatno je razlog zašto je koncentracija DON-a u istraživanim craft pivima bila uglavnom mala. Veće koncentracije DON-a određene u istraživanim industrijskim pivima vjerojatno su posljedica upotrebe mikrobiološki lošije sirovine za istraživanu šaržu piva. Nadalje, u industrijskim pivovarama kvasac se koristi višekratno te uslijed toga ima manji kapacitet vezivanja ksenobiotika na svoju staničnu stjenku.

Kostelanska i sur. (2009) proveli su istraživanje na 176 uzoraka piva te utvrdili ovisnost udjela alkohola i koncentracije DON-a. Naime, u uzorcima s većim volumnim udjelom alkohola određene su veće koncentracije DON-a. Isto tako, Varga i sur. (2013) utvrdili su manje koncentracije DON-a u pivima s udjelom alkohola manjim od 0,5%, u usporedbi s pivima većeg udjela alkohola. Uzrok tome je vjerojatno veći udjel suhe tvari (ekstrakta) sladovine koja se koristi za proizvodnju piva s većim udjelom alkohola, odnosno veća količina slada koja se mora ukomiti (Kostelanska i sur., 2009). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu potvrdili navedene tvrdnje, vjerojatno zbog premalog broja reprezentativnih uzoraka piva (35 uzoraka) s malim rasponom udjelom alkohola (3,8 – 7,5%). Od ukupno 18 uzoraka s udjelom alkohola do 5% u 14 je detektiran DON u koncentraciji od 4,12 do 18,16 ng mL⁻¹, dok od 13 uzoraka s udjelom alkohola većim od 5,1% DON se nalazi u 9 uzoraka u koncentraciji od 4,12 do 17 ng mL⁻¹ (**tablica 6; tablica 7**). U pivima s nižim udjelom alkohola tako je

koncentracija DON-a nešto veća ($18,16 \text{ ng mL}^{-1}$) u odnosu na piva sa većim udjelom alkohola (17 ng mL^{-1}).

Nadalje, Kostelanska i sur. (2009) utvrdili su da piva s dodatkom specijalnih tipova sladova prženih na višim temperaturama (tamna i crna piva) imaju veće koncentracije DON-a, što također nije potvrđeno ovim istraživanjem. U **tablici 5** uzorci piva su podijeljeni u pet grupa: svijetlo (17 uzoraka), crveno (2 uzorka), pšenično (3 uzorka), crno (6 uzoraka), tamno/tamno jako (6 uzoraka). U 13 svijetlih piva u kojima je prisutan DON, njegova koncentracija se kreće od $4,12$ do $18,16 \text{ ng mL}^{-1}$, u jednom crvenom pivu koncentracija je $4,12 \text{ ng mL}^{-1}$, a u drugom DON nije detektiran. Od tri pšenična piva samo u jednom pivu je prisutan DON u koncentraciji od $4,16 \text{ ng mL}^{-1}$. U tri uzorka od šest tamnih/jakih tamnih piva DON se nalazi u koncentraciji od $4,12$ do $5,92 \text{ ng mL}^{-1}$, te od šest uzoraka crnih piva koncentracija DON-a u tri uzorka je od $4,12$ do $11,68 \text{ ng mL}^{-1}$, a u preostala tri DON nije prisutan. Prema navedenim rezultatima, svijetla piva su sadržavala veće koncentracije DON-a u usporedbi s tamnim i crnim pivima.

Pri tumačenju kontaminacije piva DON-om potrebno je uzeti i u obzir razlike u proizvodnim tehnologijama kao i kvalitetu sirovina pri proizvodnji piva.

Prema dobivenim rezultatima koncentracije DON-a u uzorcima se kreću u rasponu od $4,12$ do $18,16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, što bi značilo da u $0,5 \text{ L}$ piva ima približno od $2,06$ do $9,08 \text{ } \mu\text{g}$ DON-a. Najveći tolerirani dnevni unos (TDI) DON-a za ljude iznosi $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase. Prema tome osoba prosječne tjelesne mase od 70 kg može unijeti $70 \text{ } \mu\text{g}$ DON-a. Svakodnevni unos $0,5 \text{ L}$ piva u kojem je koncentracija DON-a od $2,06$ do $9,08 \text{ } \mu\text{g}$ ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi. Naime, čovjek prosječne težine $70,8 \text{ kg}$ morao bi popiti od $7,8$ do $34,4$ piva kako bi unio DON-a u količini većoj od TDI. Kod procijene rizika također treba uzeti u obzir i ostale izvore DON-a u prehrani (zajedno s njihovim koncentracijama), te prosječni unos tih namirnica.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Prisutnost DON-a detektirana je u 22 od 34 uzorka piva - četrnaest industrijskih i osam craft piva.

Najveća koncentracija DON-a iznosila je $18,16 \text{ ng mL}^{-1}$, dok je najmanja koncentracija iznosila $4,12 \text{ ng mL}^{-1}$.

Istraživani uzorci industrijskih piva u usporedbi s craft pivima sadržavali su veće koncentracije DON-a. Moguć uzrok tome je korištenje žitarica kontaminiranih DON-om u proizvodnji piva.

Koncentracije DON-a bile su veće u uzorcima svijetlih piva, u odnosu na tamna i crna piva, što nije u skladu s literaturnim podacima.

Pojavnosti DON-a te njegove koncentracije u istraživanim pivima su u skladu s dostupnim literaturnim podacima.

Svakodnevna umjerena konzumacija piva (0,5 L) s koncentracijom DON-a od 2,06 do $9,08 \text{ } \mu\text{g}$ ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi, jer se takvom konzumacijom ne prelazi TDI od $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase.

6. LITERATURA

-
- Annesley TM: Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49: 1041-1044, 2003.
- Ashcroft AE: An Introduction to Mass Spectrometers. *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*. Centre for Biomolecular Sciences, School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK, 1997.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA: Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 57–81, 2010.
- Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. US National Library of Medicine National Institutes of Health 16: 497-516, USA, 2003.
- Boeira LS, Bryce JH, Stewart GG, Flannigan B: Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeasts. 2. Deoxynivalenol and nivalenol. *Journal of the Institute of Brewing* 105: 376-381, 1999.
- Brewers Association: *Craft brewer defined*.
<https://www.brewersassociation.org/statistics/craft-brewer-defined/> [7.9.2016.]
- Boeira LS, Bryce JH, Stewart GG, Flannigan B: Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zerealenone, deoxynivalenol and fumonisin B1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50:69-81, 2002.
- Cutillas PR, Timms JF: *LC-MS/MS in proteomics. Methods and applications*. Springer, London, 2010.
- Cavret S, Lecoecur, S: Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology* 44(3): 444-453, 2006.
- Charmley LL, Trenholm HL, Prelusky DB, Rosenberg A: Economic losses and decontamination. *Natural Toxins* 3: 199-203, 1995.
- Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*, 145-155. Kugler, Zagreb, , 2003.
- EFSA, European Food Safety Authority: *Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure*. EFSA, Parma, Italy, 2013.
-

-
- Ehling G, Cockburn A, Snowdon P, Buchhaus H: The significance of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health, *Cereal Research Communications* 25: 433-447, 1997.
- Eriksen GS, Pettersson H: Toxicological evaluation of trichotecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114: 205-239, 2004.
- Giovenzana V, Beghi R, Guidetti R: Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of food engineering*, 2014.
- HAH, Hrvatska agencija za hranu, 2013. <http://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/> [20.5.2016]
- Hussein HS, Brasel JM: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134, 2001.
- Inoue T, Nagatomi Y, Uyama A, Mochizuki N: Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. Research Laboratories for Food Safety Chemistry, Asahi Group Holdings Ltd, Moriya, Ibaraki 302-0106, Japan, 2013.
- Kell J: *What You Didn't Know About the Boom in Craft Beer*. Fortune, 2016.
<http://fortune.com/2016/03/22/craft-beer-sales-rise-2015/> [7.9.2016.]
- Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu, Kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Kosalec I, Pepeljnjak S: Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze. *Praxis Veterinaria* 52: 169-181, 2004.
- Kostelanska M, Hajslova J, Zachariasova M, Malachova A, Kalachova K, Poustka J, Fiala J, Scott PM, Berthiller F, Krska R: Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 3187–3194, 2009.

-
- Lancova K, Hajslova J, Poustka J, Krploava A, Zachariasova M, Dostalek P, and Sachambula L: Tranfser of fusarium mycotoxins and "masked" deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants* 25: 732–744, 2008.
- Logrieco A, Bottalico A, Ricci V: Occurence of Fusarium species and mycotoxins in cereal grains from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea* 29: 81-89, 1990.
- Lowe DP – Arendt EK: The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing withtheir relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing. *Journal of the Institute of Brewing* 110: 163–180, 2004.
- Marić V, Nadvornik Z: *Pivo - tekuća hrana*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
- Marić V, Šantek B: *Tehnologija piva*. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009.
- Moss MO, Thrane U: Fusarium taxonomy with relation to trichotecene formation. *Toxicology Letters* 153: 23-28, 2004.
- Neissen LM: Entwicklung und Anwendung immunchemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger Fusarium-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden von Bieren. *Doktorski rad*. Technical University, Munich, 1993.
- Noots I, Delcour JA, Michiels CW: From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Reviews in Microbiology* 25: 121-153, 1998.
- HS, Hrvatski sabor: Pravilnik o pivu. *Narodne novine* 46/07, 84/08, 55/11, 2011.
- Ožegović L, Pepeljnjak S.: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.
- Oliveira CAF: Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects* 1: 59-62, 2013.
-

-
- Papadopoulou A, Wheaton L, Muller R: The control of selected micro-organism during the malting process. *Journal of the Institute of Brewing* 106: 179-188, 1999.
- Papadopoulou-Bouraoui A, Vrabcheva T, Valzacchi S, Stroka J, Anklam E: Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives and Contaminants* 21: 607-617, 2004.
- Pleadin J, Frece J, Vasilj V, Markov K: Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 10 (1-2): 6-13, 2015.
- Pestka JJ: DON: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283-298, 2007.
- Plavšić F, Žuntar I: *Uvod u analitičku toksikologiju*, 188-189. Školska knjiga, Zagreb, , 2006.
- Romer Labs: <http://www.romerlabs.com/sr/products/mycotoxins/immunoaffinity-columns/> [12.6.2016]
- Schwarz PB, Casper HH, Beattie S: Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53: 121-127, 1995.
- Schwarz PB, Casper HH, Barr J, Musial M: Impact of Fusarium head blight on the malting and brewing quality of barley. *Cereal Research Communications* 25: 813-814, 1997.
- Schwarz PB, Jones B L, Steffenson B J: Enzymes associated with Fusarium infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60: 130-134, 2002.
- Shephard GS: Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 1215-1224, 2009.
- Smith J, Moss M: *Mycotoxins formation, analysis and significance*. John Wiley & Sons, New York, 1985.
-

-
- Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R: A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1505-1523, 2007.
- Stojanović A, Daković A, Matijašević S, Rottinghaus G, Sekulić Ž, Stanić T: Adsorpcija T-2 toksna mineralnim adsorbentima. Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija, 59-60, 2008.
- Sudakin DL: Trichotecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97-107, 2003.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani* 31-39. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.
- Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation s – transferaze na produkciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Trucksess MW, Pohland AE: *Mycotoxin protocols*, 97-113. Humana Press Inc., New Jersey, USA, 2010,
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA: Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta* 632: 168-180, 2009.
- Van Nierop SNE, Rautenbach M: The impact of microorganisms on barley and malt quality - a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*: 64, 69-78, 2006.
- Varga E: Validation and application of an LC-MS/MS based multi target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. *Diplomski rad*. University of Natural Resources and Applied Life Science, Beč, 2010.
- Varga E: Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyldeoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30. 137-146, 2013.
-

WHO, World Health Organization. *Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot*. Environmental Health Criteria 105, Geneva, Švicarska, 1990.

Wolf-Hall CE, Schwarz PB: Mycotoxins and fermentation-beer production. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504: 217-226, 2002.